

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H00970

研究課題名(和文) 家畜の監視伝染病等の病原体に対するインターフェロン依存的生体防御応答の解明

研究課題名(英文) Elucidation of interferon-dependent host defense system against legal infectious disease-causing microbes for domestic animals

研究代表者

山本 雅裕 (YAMAMOTO, MASAHIRO)

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：00444521

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,300,000円

研究成果の概要(和文)：トキソプラズマは家畜の監視伝染病等の病原体の一つである。トキソプラズマは、核を持つ全ての温血動物の細胞に感染することができる細胞内偏性寄生性原虫である。世界の人口の約3分の1がトキソプラズマに感染しているとされているが、多くの感染は無症状である。しかし、免疫不全のヒトや動物においては、致死的なトキソプラズマ症を引き起こすことがある。また、トキソプラズマはアメリカ合衆国において経済的損失と生活の質の低下を引き起こす食中毒の原因となる病原体の上位5つに含まれており、その農学的観点から寄生虫学的な特性を知る必要性があった。本研究によって、新規病原性分子、特にIWS1とGRA72を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はトキソプラズマの病原性における転写因子IWS1の重要性を明らかにし、新たな治療標的の可能性を示した。IWS1およびROP18の機能とその相互作用の理解が進むことで、トキソプラズマのヒトおよび家畜感染症に対する新しい治療法の開発に寄与することが期待される。またトキソプラズマ原虫は一度感染すると、完全に排除することは不可能で一生に渡って感染し続けるが、本研究で同定された多数の病原性因子はトキソプラズマ原虫の『弱点』であり、それらを標的とした様々な新規治療法や家畜動物用のワクチンの開発が大いに期待される。

研究成果の概要(英文)：Toxoplasma is one of the pathogenic organisms that cause notifiable diseases in livestock. Toxoplasma is an obligate intracellular parasitic protozoan capable of infecting the cells of all warm-blooded animals with nuclei. It is estimated that about one-third of the world's population is infected with Toxoplasma, though many infections are asymptomatic. However, in immunocompromised humans and animals, it can cause fatal toxoplasmosis. Additionally, Toxoplasma is among the top five pathogens causing foodborne illnesses in the United States, leading to economic losses and a decrease in quality of life. Therefore, understanding its parasitological characteristics from an agricultural perspective was necessary. This study identified new pathogenic molecules, particularly IWS1 and GRA72.

研究分野：獣医寄生虫学

キーワード：インターフェロン トキソプラズマ 家畜病原体 病原性因子

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) トキソプラズマは、核を持つ全ての温血動物の細胞に感染することができる細胞内偏性寄生性原虫である。世界の人口の約 3 分の 1 がトキソプラズマに感染していると推定されているが、多くの感染は無症状である。しかし、免疫不全のヒトや動物においては、致死的なトキソプラズマ症を引き起こす可能性がある。また、トキソプラズマはアメリカ合衆国において経済的損失と生活の質の低下を引き起こす食中毒の原因となる病原体の上位 5 つにランクインしている。このため、トキソプラズマは重要なヒトおよび動物の病原体である。トキソプラズマは感染細胞内に寄生胞を形成し、宿主細胞のインターフェロン  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 依存性免疫を抑制するために様々な分子を分泌する。その理由は、IFN- $\gamma$  は多くの抗トキソプラズマ免疫関連遺伝子を強力に誘導するからであり、特に Irgb6 は寄生胞の破壊に重要であり、他の GTPase やエフェクターに先立って寄生胞に蓄積し、トキソプラズマの排除を促進する。それに対して、トキソプラズマは感染時には、ロプトリーやデンスグラニューールから様々な分子を分泌し、特にロプトリータンパク質 (ROPs) やデンスグラニューールタンパク質 (GRAs) は IFN- $\gamma$  依存性免疫を抑制する。特に ROP18 は Irgb6 を標的とし、宿主の IFN- $\gamma$  依存性免疫を回避するために重要である。しかし、どのような機序で ROP18 がトキソプラズマ内で生成されるのかについては不明な点が多かった。

(2) トキソプラズマが免疫能を持つ宿主内で生存するために多くの病原性因子を利用していることが含まれる。これらの因子は、主に ROPs や GRAs などの分泌性タンパク質として知られているが、非分泌性の病原性因子についてはほとんど知られていない。本研究では、C57BL/6 マウスを用いた生体内 CRISPR スクリーニングシステムを開発し、分泌性および非分泌性の病原性因子の両方を特定することを目指した。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、トキソプラズマ由来の分子がどのようにして宿主の抗トキソプラズマ免疫分子である Irgb6 に依存した細胞自律免疫を標的とするのかを解明することである。具体的には、未解明のトキソプラズマ遺伝子が Irgb6 依存性宿主防御の抑制に関与するかどうかを調査するため、複数の I 型トキソプラズマのタンパク質の関与をテストした。その結果、転写因子と推定される IWS1 が ROP18 依存的な病原性に重要であることが判明した。IWS1 を欠失したトキソプラズマは、Irgb6 および他の IFN 誘導性 GTPase の寄生胞への蓄積が著しく増加し、マウスにおける病原性が大幅に低下した。さらに、ROP18 を過剰発現させた IWS1 欠失トキソプラズマは、寄生胞への IFN 誘導性 GTPase の蓄積を減少させ、野生型マウスでの病原性を回復させた。これらの結果から、IWS1 は ROP18 mRNA の発現を介して、IFN- $\gamma$  依存性の宿主防御を抑制するために重要であることが示された。

(2) また、トキソプラズマの分泌性および非分泌性の病原性因子が宿主の IFN- $\gamma$  依存性免疫応答にどのように関与しているかを明らかにすることである。具体的には、免疫能を持つ C57BL/6 マウスおよび IFN- $\gamma$  受容体欠損 (Ifngr1<sup>-/-</sup>) マウスを用いた生体内 CRISPR スクリーニングを実施し、IFN- $\gamma$  依存性および非依存性の病原性因子を特定することを目指した。これにより、既知の ROPs や GRAs に加え、新規の非分泌性タンパク質が病原性に関与していることが判明した。特に、GRA72 が GRA17 および GRA23 の正しい局在化に関与し、UFM 化関連遺伝子が IFN- $\gamma$  依存性病原性に関与することが示された。

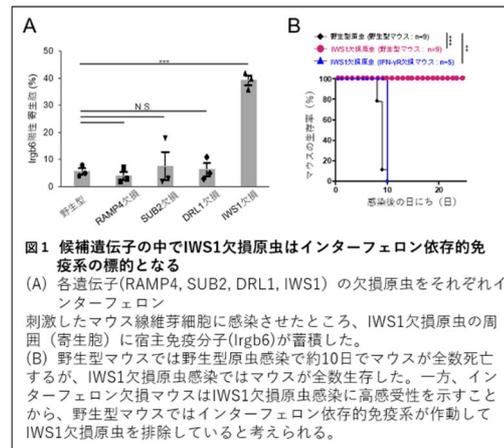
### 3. 研究の方法

(1) 本研究では、CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を用いて、IWS1、SUB2、RAMP4、DRL1 を欠失させたタイプ I トキソプラズマ株を作製した。これらの変異株をマウス線維芽細胞 (MEFs) に感染させ、IFN- $\gamma$  刺激後の Irgb6 の寄生胞への蓄積を評価した。また、IWS1 欠失株に IWS1 を再導入し、Irgb6 の寄生胞への蓄積を再評価した。さらに、IWS1 欠失株を用いた生体内試験を行い、マウスへの感染後の病原体の広がりや組織内の寄生虫数をルシフェラーゼ発光を基準測定した。加えて、RNA-seq および ChIP-seq 解析を実施し、IWS1 欠失が ROP18 mRNA 発現に及ぼす影響と、その制御メカニズムを解明した。

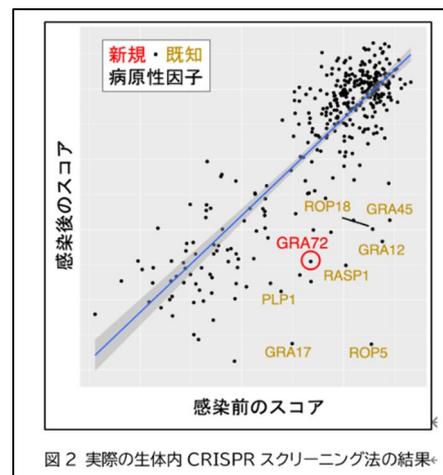
(2) また、生体内 CRISPR スクリーニングシステムを構築するために、修正された pU6-Universal ベクターを用いてトキソプラズマの変異株を作製した。このベクターには、リボソームスキップペプチド (T2A)、ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) 薬剤選択マーカー、T2A、および赤色蛍光タンパク質 (RFP) がカセットとして組み込まれている。選択されたガイド RNA (gRNA) ライブラリーを用いて、Vero 細胞で変異株を増殖させ、ピリメタミン存在下で選択した。次に、これらの変異株を C57BL/6 マウスに感染させ、脾臓から単細胞懸濁液を回収し、Vero 細胞でさらに増殖させた。遺伝子の生体内および in vitro フィットネススコアを計算し、高再現性のある CRISPR スクリーニングシステムの確立を目指した。

#### 4. 研究成果

(1) トキソプラズマの転写因子 IWS1 が ROP18 mRNA の発現に重要であり、IFN- $\gamma$  依存性の宿主免疫を抑制するために必要であることが明らかになった。IWS1 を欠失したトキソプラズマは、Irgb6 および他の IFN 誘導性 GTPase の寄生胞へのリクルートメントが増加し (図 1A)、マウスでの病原性が低下した (図 1B)。RNA-seq 解析により、IWS1 欠失株では ROP18 を含む多くの遺伝子の発現が低下していることが示され、ChIP-seq 解析では IWS1 が直接的に ROP18 遺伝子領域に結合しないことが明らかになった。さらに、ROP18 を過剰発現させた IWS1 欠失株では、IFN 誘導性 GTPase の寄生胞への蓄積が減少し、生体内での病原性が回復した。これらの結果は、IWS1 が ROP18 mRNA の発現を間接的に制御し、トキソプラズマが IFN- $\gamma$  依存性の抗寄生虫免疫を回避するために重要な役割を果たしていることを示している。まず、IWS1 の欠失は、トキソプラズマの病原性に著しい影響を与えることがわかった。具体的には、IWS1 欠失トキソプラズマは、IFN- $\gamma$  依存性の宿主免疫応答を抑制できず、宿主の免疫系によってより効果的に排除される。IWS1 の欠失により、Irgb6 および他の IFN 誘導性 GTPase が寄生胞に高頻度で蓄積されることが観察された。これにより、トキソプラズマの病原性が著しく低下し、IWS1 欠失株を感染させたマウスの生存期間が延長された。次に、RNA-seq 解析では、IWS1 欠失株において、ROP18 を含む多くの遺伝子の発現が低下していることが示された。これにより、IWS1 が ROP18 mRNA の発現を間接的に制御していることが示唆された。ChIP-seq 解析では、IWS1 が直接的に ROP18 遺伝子領域に結合しないことが明らかになり、IWS1 が他の転写因子を介して ROP18 の発現を制御している可能性が示された。さらに、ROP18 を過剰発現させた IWS1 欠失株では、IFN 誘導性 GTPase の寄生胞へのリクルートメントが減少し、野生型株と同様の病原性が回復した。この結果は、ROP18 がトキソプラズマの病原性において重要な役割を果たしていることを示している。また、IWS1 欠失株の病原性低下は、ROP18 以外の IWS1 依存性遺伝子の関与も示唆している。具体的には、SRS29B (TGGT1\_233460) および他の機能未知のタンパク質が IFN- $\gamma$  依存性だが IFN 誘導性 GTPase 非依存性の宿主防御に関与している可能性がある。以上のことから、本研究はトキソプラズマの病原性における転写因子 IWS1 の重要性を明らかにし、新たな治療標的の可能性を示した。IWS1 および ROP18 の機能とその相互作用の理解が進むことで、トキソプラズマ感染症に対する新しい治療法の開発に寄与することが期待される。



(2) 生体内 CRISPR スクリーニングの結果、GRA72 を新規病原性因子として同定した (図 2)。トキソプラズマの IFN- $\gamma$  依存性および非依存性の病原性因子が特定された。特に、GRA72 は GRA17 および GRA23 の正しい局在化に重要であり、これらのタンパク質の局在が異常になると、寄生胞が「バルーン状」の形態を示すことが判明した。GRA72 欠失株では、GRA17 および GRA23 が寄生胞膜上に正常に配置されず、寄生虫の病原性が著しく低下した。また、ROP18 や GRA12、GRA45 などの既知の病原性因子も IFN- $\gamma$  依存性であることが確認された。さらに、UFM1、UBA5、UFC1、UFL1、UFSP などの UFM 化関連遺伝子が新たに同定され、これらが IFN- $\gamma$  依存性の生体内フィットネスに寄与することが示された。CRISPR スクリーニングにより、C57BL/6 マウスと IFN- $\gamma$  受容体欠損マウスの比較解析を行い、既知および新規の病原性因子を同定した。特に、GRA72 が GRA17 および GRA23 の局在化に与える影響を詳しく解析し、これらのタンパク質が PVM の維持にどのように関与しているかを明らかにした。GRA72 欠失株では、GRA17 および GRA23 の局在が異常になり、PVs の形態が変化することが観察された。この結果は、GRA72 が寄生胞膜の正常な機能を維持するために必要なタンパク質であることを示している。また、UF-ミル化関連遺伝子が IFN- $\gamma$  依存性の病原性に関与しており、これらの遺伝子が寄生虫の生体内フィットネスに重要な役割を果たしていることが示された。さらに、異なる遺伝的背景を持つマウスモデルを用いることで、トキソプラズマの病原性因子の特定が可能であり、将来的には他の宿主や環境におけるフィットネス遺伝子の解析に役立つと考えられる。これにより、トキソプラズマ症に対する新しい治療法の開発に貢献できる可能性がある。本研究は、宿主遺伝学と CRISPR スクリーニングを組み合わせることで、トキソプラズマの病原性因子の理解を深める新たなアプローチを提供した。他の成果としては、GRA72 が GRA17



および GRA23 の局在化に直接関与しているかどうかを解明するためのさらなる研究が示唆された。GRA17 および GRA23 は、寄生虫と宿主の間で小分子の交換を可能にする膜孔を形成することが知られており、これらのタンパク質の誤った局在は寄生胞膜の異常を引き起こす可能性がある。また、UFM 化関連遺伝子が IFN- $\gamma$  依存性のフィットネスに重要な役割を果たすことが確認されたことから、これらの遺伝子が標的タンパク質に対してどのように作用するかを解明することが今後の課題とされる。さらに、本研究の方法論は、他の宿主や環境におけるトキソプラズマの病原性因子の解析にも応用できる可能性がある。例えば、ヒト化マウスや他の動物モデルを用いることで、特定の宿主環境における病原性因子の役割を明らかにすることができる。このアプローチにより、トキソプラズマの病態生理の理解が進み、新たな治療法の開発が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Tachibana Yuta, Hashizaki Emi, Sasai Miwa, Yamamoto Masahiro	4. 巻 42
2. 論文標題 Host genetics highlights IFN- $\gamma$ -dependent Toxoplasma genes encoding secreted and non-secreted virulence factors in in vivo CRISPR screens	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 112592 ~ 112592
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2023.112592	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hashizaki Emi, Sasai Miwa, Okuzaki Daisuke, Nishi Tsubasa, Kobayashi Takashi, Iwanaga Shiroh, Yamamoto Masahiro	4. 巻 14
2. 論文標題 Toxoplasma IWS1 Determines Fitness in Interferon- $\gamma$ -Activated Host Cells and Mice by Indirectly Regulating ROP18 mRNA Expression	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 e0325622
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mbio.03256-22	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Sasai Miwa, Ma Ji Su, Okamoto Masaaki, Nishino Kohei, Nagaoka Hikaru, Takashima Eizo, Pradipta Ariel, Lee Youngae, Kosako Hidetaka, Suh Pann-Ghill, Yamamoto Masahiro	4. 巻 218
2. 論文標題 Uncovering a novel role of PLC $\gamma$ 4 in selectively mediating TCR signaling in CD8+ but not CD4+ T cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 e20201763
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1084/jem.20201763	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Pradipta Ariel, Sasai Miwa, Motani Kou, Ma Ji Su, Lee Youngae, Kosako Hidetaka, Yamamoto Masahiro	4. 巻 4
2. 論文標題 Cell-autonomous Toxoplasma killing program requires Irgm2 but not its microbe vacuolar localization	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e202000960
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26508/lisa.202000960	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Pradipta Ariel, Bando Hironori, Ma Ji Su, Tanaka Shun, Sasai Miwa, Yamamoto Masahiro	4. 巻 83
2. 論文標題 Plasmodium UIS3 avoids host cell-autonomous exclusion that requires GABARAPs but not LC3 and autophagy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 102335 ~ 102335
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2021.102335	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Lee Youngae, Yamada Hiroshi, Pradipta Ariel, Ma Ji Su, Okamoto Masaaki, Nagaoka Hikaru, Takashima Eizo, Standley Daron M, Sasai Miwa, Takei Kohji, Yamamoto Masahiro	4. 巻 3
2. 論文標題 Initial phospholipid-dependent Irgb6 targeting to Toxoplasma gondii vacuoles mediates host defense	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 549
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lisa.201900549	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Bando Hironori, Pradipta Ariel, Iwanaga Shiroh, Okamoto Toru, Okuzaki Daisuke, Tanaka Shun, Vega-Rodriguez Joel, Lee Youngae, Ma Ji Su, Sakaguchi Naoya, Soga Akira, Fukumoto Shinya, Sasai Miwa, Matsuura Yoshiharu, Yuda Masao, Jacobs-Lorena Marcelo, Yamamoto Masahiro	4. 巻 216
2. 論文標題 CXCR4 regulates Plasmodium development in mouse and human hepatocytes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 1733 ~ 1748
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1084/jem.20182227	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Bando Hironori, Lee Youngae, Sakaguchi Naoya, Pradipta Ariel, Sakamoto Ryoma, Tanaka Shun, Ma Ji Su, Sasai Miwa, Yamamoto Masahiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Toxoplasma Effector GRA15-Dependent Suppression of IFN- $\gamma$ -Induced Antiparasitic Response in Human Neurons	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcimb.2019.00140	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山本雅裕
2. 発表標題 トキソプラズマ原虫に対する宿主セルオートノマス免疫系とその破綻
3. 学会等名 第75回 日本細胞生物学会大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	高島 康弘  (TAKASHIMA YASUHIRO)  (20333552)	岐阜大学・応用生物科学部・准教授    (13701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計1件

国際研究集会 The 20th Awaji International Forum on Infection and Immunity	開催年 2022年～2022年
--	--------------------

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------